

**Bestimmung des spezifischen
Gewichtes von Carcinomzellen
mit Hilfe der Siliconflotation**

Axel-Sven Tranekjer

1961

**Bestimmung des spezifischen
Gewichtes von Carcinomzellen
mit Hilfe der Siliconflotation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Axel-Sven Tranekjer
aus Saarbrücken

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. W. BICKENBACH
Dekan: Professor Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.1961



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	5
Vorversuche	5
Problemstellung	8
Methodik	9
Theoretische Grundlagen der Methode	11
Wesen und Anwendungsgebiet der Flotation.	
Strömungseigenschaften der benutzten Stoffe.	
Physikalische Probleme beim Zentrifugieren.	
Gesetze der Sedimentation.	
Theorie der Flotation.	
Kurze Zusammenfassung der Versuchsbedingungen.	
Auswertung der Versuche; Versuchsergebnisse.	20
Diskussion der Ergebnisse	37
Zusammenfassung	43
Literaturverzeichnis	44
Anhang: Tabellen	45



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555208_0013

EINLEITUNG

Angaben über das spezifische Gewicht von Blutbestandteilen sind lange bekannt. Reznikoff (1923), Opitz und Frei (1923) geben für Erythrocyten Werte zwischen 1070 und 1100 an. Pezotti (1925) stellte Messreihen für die Dichte der roten Blutkörperchen auf - berechnet aus dem Verhältnis von Gewicht pro Erythrocytenvolumen - deren Werte zwischen 1088 und 1108 schwanken. Kellner (1953), der methodisch mit dem Prinzip der Flotation arbeitet und dabei Phthalsäurediäthylester als Trennmedium benutzt, fand Werte von 1885 bis 1123.

Das spezifische Gewicht der Leukocyten liegt zwischen dem spezifischen Gewicht des Plasmas (1030) und dem der Erythrocyten. Ein Grossteil der Leukocyten ist schwerer als 1075. Lymphocyten dagegen sind leichter. Exakte Angaben liegen bisher noch nicht vor.

Für das spezifische Gewicht von Carcinomzellen gibt Seal Werte um 1056 an.

Mit Hilfe der Flotationsmethode lassen sich alle diese Blutbestandteile fraktionieren. Das Prinzip der Methode beruht auf einfachen physikalischen Vorgängen. Massenteilchen mit verschiedenen spezifischen Gewichten sedimentieren mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, sobald man sie in wässrige Lösung bringt. Mit einer Zentrifuge lassen sich diese Vorgänge beschleunigen. Roberts und Mitarbeiter benutzten die Methode unter Zwischenschaltung eines Trennmediums, das in seinem spezifischen Gewicht zwischen den Gewichten der zu trennenden Zellbestandteile liegt, zur Gewinnung von Tumorzellen aus strömendem Blut.

Seal verwendet die Methode zur Lösung des gleichen Problems, wobei er Silicon mit einem spezifischen Gewicht von 1075 als Trennmedium benutzt. Dabei dient Polyvinyl - pyrrolidin als Suspensionsflüssigkeit.

VORVERSUCHE

Wir prüften die Seal'sche Methode in 3 Modellversuchen. Die Durchführung dieser Versuche war standardisiert.

Materialgewinnung:

1. Entnahme von histologisch gesichertem Tumormaterial mit Hilfe einer Curette; Aufschwemmen des Materials in Ringerlösung; Homogenisieren und Verdünnen in Poly - vinyl - pyrrolidin (PVP). Anfertigen von Kontrollausstrichen.
2. Gewinnung von 20 ml Citratblut (aus der Cubitalvene der jeweiligen Patientin).

Versuchsgang:

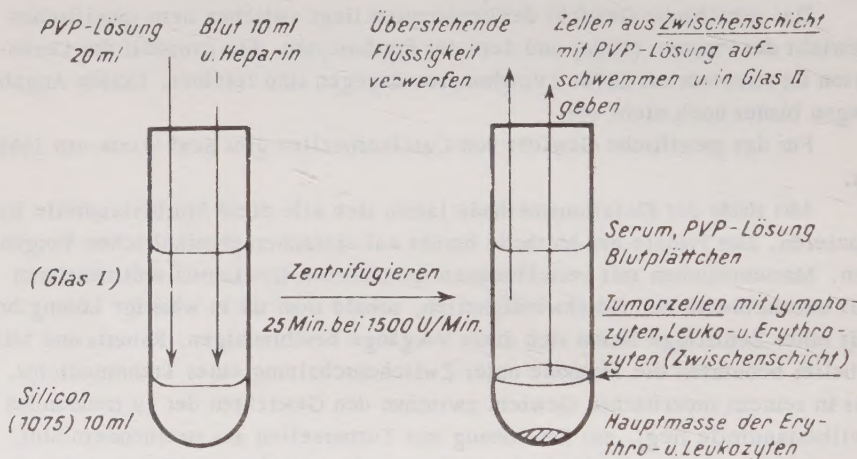
In ein siliconisiertes Zentrifugenglas von 100 ml Rauminhalt werden 20 ml Silicon S.G. 1075 eingefüllt. Man überschichtet 40 ml PVP - Lösung, fügt vor-

sichtig 10 ml Tumorzellsuspension hinzu, und pipettiert 20 ml Citratblut in die PVP - Lösung. Bei 1500 U/min. wird nun das Ganze 15 Minuten zentrifugiert.

Ergebnis des 1. Trennungsganges:

Unter dem Silicon liegt ein rotes Sediment, Erythrocyten und polymorph-kernige Leukocyten.

Zwischen dem Silicon und der darüber stehenden Flüssigkeit liegt eine graue Schicht, die Tumorzellen enthält.



Mit einer Stangenpipette saugt man nun den Überstand bis auf einen halben Zentimeter über der grauen Schicht ab. Der Überstand wird zur Kontrolle aufbewahrt. Die grau - weisse Schicht dekantiert man mit Hilfe einer Recordspritze mit länger V2A - Kanüle. Um Zellverluste zu vermeiden, wird die Siliconoberfläche mit 50 ml PVP - Lösung abgewaschen. Der gesamte gewaschene Überstand wird in ein Zentrifugenglas gebracht und mit einigen Tropfen 2% Saponin versetzt. Man stößelt das Glas ab und schüttelt 10 Minuten. Nach dieser Zeit sind die letzten Erythrocyten hämolytiert. Es wird nun erneut zentrifugiert (800 U/min; Dauer 30 min).

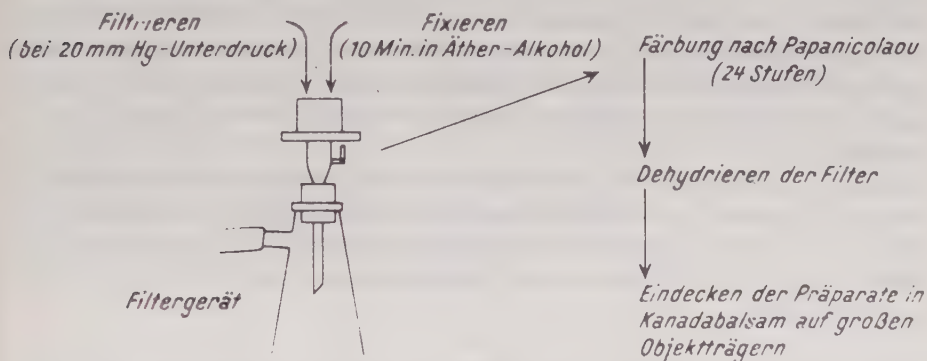
Ergebnis des 2. Trennungsganges:

Am Boden des Zentrifugenglases liegt ein grauweisses Sediment, das unter anderem die Tumorzellen enthält.

Der Überstand wird bis auf einen halben Zentimeter über dem Sediment entfernt und verworfen.

In der verbleibenden PVP - Lösung wird das Sediment suspendiert und auf einen Filter gebracht. Wir verwenden dabei die Saugfiltermethode; als Filter dienen Cella - Membranfilter im Gegensatz zu Seal, der Millipore - Filter benutzt.

Die Fixierung der Zellen erfolgt auf dem Filter mit Alkohol - Äther. (Dauer 10 Minuten).



Die fixierten Filter werden nach Papanicolaou gefärbt, auf einen grossen Objektträger gebracht und mit Canadabalsam eingedeckt.

Um einen Überblick über das Trennvermögen der Methode zu bekommen, wurden folgende Filter angelegt:

1. ein Kontrollfilter aus der überstehenden Flüssigkeit über dem Silicon.
2. zwei Filter aus der "Tumorzellschicht"
3. ein Kontrollfilter aus dem Erythrocytensediment unter dem Silicon.

Zur Erleichterung wurden die Rundfilter in Quadranten eingeteilt. Unter dem Mikroskop wurde bei jedem Filter der gleiche Quadrant ausgezählt.

Histologie des verwendeten Zellmaterials:

Fall 1. mittelreifes Plattenepithelcarcinom,

Fall 2. unreifes Adenocarcinom,

Fall 3. unreifes Plattenepithelcarcinom.

Versuchsergebnis:

TABELLE 1

	Anzahl der diagnostizierten Carcinomzellen		
	Kontrolle d. Überst.	Kontrolle d. Sediment.	"Tumorzellschicht"
Fall 1	-	1	156
Fall 2	2	-	242
Fall 3	-	1	159
Gesamt.	2	2	557

Aus Tab. 1 geht hervor, dass 99,28 % aller diagnostizierten Carcinomzellen in der von Seal angegebenen grauen Schicht über dem Silicon gefunden wurden.

den. Nur jeweils 0,36 % aller Carcinomzellen fanden wir in der überstehenden Flüssigkeit bzw. dem Sediment. Das Auftreten von Carcinomzellen im Sediment unter dem Silicon lässt sich erklären. Um das Erythrocytensediment für den Kontrollfilter zu gewinnen, muss man den Siliconüberstand absaugen; trotz vorheriger Spülung mit 50 ml PVP - Lösung können immer noch vereinzelt Tumorzellen am Rande des Zentrifugenglases hängen bleiben, die dann mit auf den Kontrollfilter gelangen.

Einwände, die sich auf die unwahrscheinlich hohe Trenngenaugigkeit der Methode beziehen, lassen sich an Beispielen aus der pharmazeutischen Industrie widerlegen. Mit Hilfe des Flotationsprinzips werden Ergotoxin, Ergotamin, Tyramin und andere Präparate von Nebensubstanzen gereinigt, wobei man Reinheitsgrade bis zu 99,8% erzielt.

PROBLEMSTELLUNG:

Wir benutzten das Prinzip der Silicon - Flotation zur Klärung folgender Fragen:

1. Wie gross ist das spezifische Gewicht von Carcinomzellen?
Wie verhält sich die biologische Streuung des spez. Gewichtes?
Wie ist das spezifische Gewicht der Tumorzellen abhängig von der histologischen Struktur des Carcinoms; bestehen besondere Abhängigkeiten vom jeweiligen Reifungsgrad und von der Lokalisation des Carcinoms?
2. In Zusatzversuchen sollte die Streuung des spezifischen Gewichtes von Zellbestandteilen im pathologischen Blut untersucht werden.
 - a) bei myeloischer Leukämie
 - b) bei lymphatischer Leukämie

Unter diesen Gesichtspunkten wurden folgende Fälle bearbeitet:

- I. Collum Carcinom.
 1. unreifes Plattenepithelcarcinom
 2. mittelreifes Plattenepithelcarcinom
 3. verhornendes Plattenepithelcarcinom
 4. Adenocarcinom
- II. Corpuscarcinom
Adenocarcinom
 - a) unreif
 - b) reif
- III. Ovarialcarcinom
- IV. Myeloische Leukämie
- V. Lymphatische Leukämie.

METHODIK:

Wir benutzten im wesentlichen das Prinzip der Seal'schen Methode, variierten aber das spezifische Gewicht des Trennmediums. Um eine möglichst grosse und exakte Streuung der verschiedenen Zelltypen eines Carcinoms zu erhalten, wählten wir für unseren Versuchsansatz als oberste Grenze eine Siliconmischung mit dem spezifischen Gewicht von 1080; durch entsprechende Variation der Mischungen erzielten wir geringe Gewichtsintervalle (1080, 1078, 1074.....) bis zur unteren Grenze unserer Versuchsanordnung bei 1050.

Es standen uns 3 Silicone zur Verfügung:

Silicon	Bayer	PH 300	S.G.	1064
"	"	PH 1000	"	1088
"	"	PN 1000	"	1039

Diese Angaben gelten für 20°C unter Normalbedingungen mit einer Schwankungsbreite von + 5 %.

Die Mischung erfolgte nach folgender Formel:

$$F1. \quad D = \frac{Da \cdot Va + Db \cdot Vb}{Va + Vb}$$

Definition der Symbole

D = gesuchte Dichte

Va = Vol. Silicon 1

Vb = Vol. Silicon 2

Da = Dichte Silicon 1

Db = Dichte Silicon 2

Das gesuchte spez. Gewicht D wird von uns festgesetzt; das Volumen des ersten Mischungsanteils Va kann man konstant 1 oder 10 wählen. Es ist dann das Volumen des zweiten Mischungsanteils Vb gesucht. Aus Gleichung F1 ergibt sich hierfür:

$$F2. \quad Vb = \frac{DVa - Da \cdot Va}{Db - D}$$

Geringe Schwankungen im spezifischen Gewicht der Silicongemische lassen sich mit Hilfe der Kupfersulfatmethode ausgleichen. Seal gibt hierfür eine verbesserte Methode an, die von Phillips, Van Slike und anderen entwickelt wurde.

In eine Rekordspritze mit dünner Kanüle zieht man einige Kubikzentimeter der zu prüfenden Mischung auf, übt auf den Kolben der Spritze einen sanften Druck aus, so dass an der Nadelspitze ein Silicontropfen hängt. Man taucht die Nadel leicht in eine Testlösung aus Kupfersulfat, deren spezifisches Gewicht bekannt ist. Steigt der Silicontropfen entlang der Nadel auf, so ist das Gemisch leichter als die Testlösung, sinkt er ab, ist er schwerer. Durch Hinzufügen einiger Tropfen des leichteren bzw. schwereren Gemischanteils lässt sich das spez. Gewicht der Mischung sehr genau einstellen. Stimmt das spezifische Gewicht der Testlösung mit dem des

Silicongemisches überein, so bleibt der Tropfen an der Nadelspitze unverändert hängen.

Versuchsgang:

Für alle Untersuchungen war der Versuchsgang konstant.

1. Gewinnung des Zellmaterials:

Aus frischem Operationsmaterial wurde carcinomatöses Gewebe entnommen, in Krebs - Ringerlösung aufgeschwemmt und homogenisiert. Es erfolgte kein Zusatz hämolytischer Substanzen.

2. Definition des Zellmaterials:

- a) durch histologische Schnitte
- b) durch cytologische Direktabstriche.

3. Flotationsvorgang:

Die Technik des Versuchsganges war im Wesentlichen die gleiche wie bei den Vorversuchen. Das Trennmedium für den ersten Trennungsgang hatte ein spezifisches Gewicht von 1080. Es wurden 40 ml PVP - Lösung überschichtet und 20 ml Tumorzellsuspension hinzugefügt. Bei 1500 U/min wurde das Ganze für die Dauer von 15 Minuten zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand über dem Silicon abgesaugt, die Siliconoberfläche mit PVP - Lösung abgewaschen und alles in einem vorbereiteten Zentrifugenglas über das Silicon der nächst niedrigeren Gewichtsstufe geschichtet (1078 für den zweiten Trennungsgang).

Man zentrifugiert erneut unter gleichbleibenden Bedingungen. Die anfallenden Sedimente unter der Siliconschicht werden abgesaugt und auf einem Filter gesammelt.

Die Fixierung der Filter geschieht mit Äther - Alkohol, (Dauer 10 min.) danach erfolgt eine Färbung nach Papanicolaou. Auf einem grossen Objektträger werden die gefärbten Filter mit Canadabalsam eingedeckt. Dieser Vorgang wird 15 mal wiederholt, bis das niedrigste spezifische Gewicht unserer Versuchsanordnung (1050) erreicht ist. Beim letzten Versuch wird zusätzlich ein Kontrollfilter aus dem Überstand über der Siliconoberfläche angelegt. Man gewinnt so alle Zellen, die leichter als 1050 sind.

THEORETISCHE GRUNDLAGEN DER METHODE;

Da unsere Methode vom physikalisch - chemischen Gesichtspunkt aus einige Klippen enthält, sollen im Folgenden ihre theoretischen Grundlagen erörtert werden. Dabei werden die Grenzen der Methode aufgezeigt; ausserdem erfolgt eine Ableitung der Versuchsbedingungen für einen sinnvollen Arbeitsbereich.

WESEN UND ANWENDUNGSGEBIET DER FLOTATION.

1877 gaben die Gebrüder Bessel ein Verfahren an, mit dem es möglich war, fein gemahlene Mineralgemische in wässriger Suspension zu trennen. Die Trennung erfolgte nach dem spezifischen Gewicht der Gemischanteile und unterliegt den Gesetzen der Sedimentation und der Zentrifugierung. Als speziellen Vorteil machte man sich die Oberflächeneigenschaften der zu trennenden Substanzen zunutze. Durch Adsorption bestimmter Chemikalien gelingt es, Gemische von Mineralien schwer benetzbar zu machen (hydrophob). Es erfolgt dann eine leichte Anhaftung der Massenteilchen an Gasblasen. Diese steigen in der wässrigen Suspension auf und bilden an der Oberfläche einen Schaum.

In der industriellen Auswertung kam es zu Verbesserungen der Methode durch Einschaltung eines hydrophoben Trennmediums in die wässrige Suspension. Das spezifische Gewicht des Trennmediums soll zwischen den spezifischen Gewichten der zu trennenden Stoffe liegen. Verstärkt man die Schwerkraft der Einzelteilchen, die in dem Medium wandern durch eine Gravitationskraft, so lässt sich dieser Trennvorgang beschleunigen.

Anwendungsgebiet der Flotation sind heute:

1. Metallurgie
2. Rohstoffveredelung
3. Pharmaceutische Industrie.

z.B. Herstellung von Ergotoxin, Ergotamin, Tyramin, Histamin.

Die Flotationsmethode beruht also auf folgenden physikalischen und chemischen Grundlagen:

1. auf den Gesetzen der Strömungslehre; sie ist abhängig von den Flieseigenschaften der benutzten Stoffe und Medien.
2. auf den Gesetzen der Sedimentation;
3. sie wird beeinflusst durch die Übertragung dieser Gesetze auf die Bedingungen im Gravitationsfeld.

A. STRÖMUNGSEIGENSCHAFTEN DER BENUTZTEN STOFFE.

Bei der Seal'schen Flotationsmethode sind im Wesentlichen die Flieseigenschaften zweier Medien zu beachten:

1. das idealviscöse Verhalten der Suspensionsflüssigkeit PVP;
2. das nichtideale Verhalten der Silicone als Trennmedien.

zu 1. Die normale Strömungslehre umfasst gesetzmässige Zusammenhänge einer sehr kleinen Stoffklasse, die man als ideale oder Newton'sche Flüssigkeiten bezeichnet. Für sie gilt das Newton'sche Reibungsgesetz:

Die Schubspannung τ ist dabei der Geschwindigkeitszunahme senkrecht zur Strömungsrichtung proportional.

$$G1. \quad \tau = \eta \frac{dv}{du} \left[\text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2} \right]$$

Aus diesen Beziehungen erhält man den Begriff der dynamischen Zähigkeit η .

Für den gegebenen Fall ist η nur von der jeweiligen Temperatur abhängig. Überträgt man Formel G1 auf den Strömungsvorgang in einer Kapillare, so gilt das Hagen - Poiseuille'sche Gesetz des kapillaren Fliessens, welches man durch Integration von G1 erhält. Zur experimentellen Ermittlung schreibt man es zweckmässig in folgender Form:

$$G2. \quad \eta = \frac{\tau_R}{D} = \frac{\tau \cdot R^4 \cdot p}{8 \cdot Q \cdot l} \left[\text{g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \right]$$

$$\text{wobei} \quad \tau = \frac{p \cdot R}{2 l} \left[\text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2} \right] \quad \text{ist.}$$

Definition der Symbole:

τ_R	Schubspannung in der Kapillarwand, wenn D das zugehörige Geschwindigkeitsgefälle ist.
R	= Radius
L	= Länge
Q	= Durchflussvolumen
P	= Wirkdruck

Man kann nun zahlenmässig ermitteln:

1. die Schubspannung τ_p
2. das Geschwindigkeitsgefälle D

$$G3. \quad D = \frac{4 Q}{R^3} \left[\text{sec}^{-1} \right]$$

Aus den Beziehungen von dynamischer Zähigkeit η und Schubspannung τ_R kann man Methoden zur Ermittlung der Viscosität derartiger idealer Flüssigkeiten entwickeln.

zu 2. Bei einer Anzahl von Stoffen besteht beim Strömen kein linearer Zusammenhang zwischen Geschwindigkeitsgefälle und Schubspannung. Ein Beispiel hierfür sind die von uns verwendeten Silicone. (Ruth N. Weltman.)

Man bezeichnet diese Eigenschaft als Strukturviscosität (Wo. Ostwald) oder nach angelsächsischen Angaben als Pseudoplastizität.

Diese Verhältnisse zwingen dazu, auf eine Konstanz der Zähigkeit wie in Gleichung 1. zu verzichten. Es lässt sich lediglich festsetzen, dass die lokale Schubspannung eines Oberflächenpunktes eine Funktion der Zähigkeit ist.

$$G4. \quad \eta = f(\tau)$$

Daraus ergibt sich als allgemeines Reibungsgesetz:

$$G5. \quad \frac{dv}{du} = \frac{\tau}{\eta(\tau)} = f(\tau)$$

Es folgt hieraus, dass z.B. in einer Röhre, in der die Schubspannung abhängig vom Achsenabstand ist, über dem Querschnitt des Siliconvolumens lokal verschiedene Zähigkeitswerte gefunden werden.

Messtechnisch ist man daher auf einen Mittelwert der lokal gefundenen Zähigkeitswerte angewiesen. Man sucht sich in einer Tabelle den Zähigkeitswert desjenigen idealen Mediums auf, das unter gegebenen Bedingungen den gleichen Durchfluss aufweist, wie der zu kennzeichnende nichtideale Stoff. Diese von τ_R abhängige Grösse kann man mit Hilfe des Hagen - Poiseuille'schen Gesetzes berechnen und als scheinbare Viscosität bezeichnen. (η') Will man die Viscositätswerte zweier nichtidealer Flüssigkeiten miteinander vergleichen, so ist das nicht ganz zulässig; es handelt sich ja jeweils nur um scheinbare Viscositätsangaben. Die Schwierigkeit für die technische Herstellung dichter - und viscositätskonstanter Silicone ergibt sich daraus von selbst.

(Bayer liefert seine Silicone mit Fehlerbreiten von $\pm 5\%$ für diese Bedingungen.)

Problematisch werden somit auch Mischungen von Siliconen nach Mischungsformeln, wenn man die Intervalle zwischen den einzelnen spez. Gewichten möglichst klein wahlen muss. Die Konstanz von Dichte und Viscosität muss aber für unsere Versuchsbedingungen unbedingt gewahrt werden. Dies lässt sich nur unter Hinzunahme von Hilfsmethoden erreichen. Wir verwenden die Kupfersulfatmethode zur Bestimmung des spez. Gewichtes.

Die Strömungsgesetze für strukturviscose Flüssigkeiten sind nur jeweils lokal für einen Punkt des Volumenquerschnittes gültig. Sie sind daher unabhängig von irgendwelchen Kapillardimensionen. Man kann sie also direkt auf die Strömungsverhältnisse in Röhren übertragen, was formal den Vorteil bietet, dass das Hagen -

Poiseuille'sche Gesetz unmittelbar übertragbar ist. Dies gilt jedoch nur für laminare Strömungen. Will man das Gesetz auch auf die Verhältnisse bei turbulenter Strömung und beim Übergang von laminarer Strömung in den turbulenten Bereich anwenden, so beschreibt man diesen Strömungsvorgang durch die Abhängigkeit eines Widerstandsbeiwertes λ von der Reynolds'schen Zahl:

a) bei idealen Flüssigkeiten.

Zwei Strömungen verlaufen geometrisch ähnlich, wenn geometrische Ähnlichkeit der verglichenen Kanäle, zeitliche Ähnlichkeit der Strömung und Ähnlichkeit der auftretenden Kräfte vorhanden sind.

$$G6. \quad \frac{\text{Trägheitskraft}}{\text{Reibungskraft}} = \frac{\rho \cdot w^2}{1} : \frac{\eta \cdot w}{1^2} = \frac{\rho \cdot l w}{\eta} = \frac{l \cdot w}{\nu} = Re$$

Definition der Symbole:

ρ = Rohrdurchmesser

w = Strömungsgeschwindigkeit

l = charakteristisches Längenmass

ν = relative Zähigkeit = $\frac{\eta}{\rho}$

Bei grösseren Rohren gibt man anstatt des charakteristischen Längenmasses den Durchmesser d_0 an und erhält:

$$G7. \quad Re = \frac{w \cdot d_0}{\nu} \quad \left[\text{dimensionslos} \right]$$

Der Übergang von laminarer Strömung in turbulente erfolgt bei bestimmten Werten dieser dimensionslosen Verhältniszahl.

b) bei strukturviscösen Flüssigkeiten.

Die Reynolds'sche Zahl lässt sich hierfür ebenso ermitteln, wenn man den Begriff der Scheinviscosität η' zu Grunde legt.

Man kann eine Reihe örtlich von den lokalen Fliessbedingungen abhängige Zahlen ermitteln, wobei dann die Rohrströmungsverhältnisse durch eine Mittelung der lokalen Reynolds'schen Zahlen beschreibbar werden. Dieser Wert wird analog der scheinbaren Viscosität als scheinbare Reynolds'sche Zahl bezeichnet.

$$Re = \frac{w \cdot d \cdot \rho}{\eta}$$

G8.

und somit $\lambda = f(Re')$

B. PHYSIKALISCHE PROBLEME BEIM ZENTRIFUGIEREN; GESETZE DER SEDIMENTATION.

1. Wirkungsweise von Zentrifugen:

Zentrifugen zum Trennen von Fest - Flüssig; Flüssig - Flüssig; bzw. Flüssig - Flüssig - Fest - Gemischen bestehen aus schnell umlaufenden Trommeln, die das in ihrem Inneren aufbewahrte Gut der Wirkung der Zentrifugalkraft aussetzen. Die Zentrifugalkraft ist eine Massenkraft. Der Absetzvorgang in der Zentrifuge lässt sich daher mit dem Sedimentieren bei mehrhundert - bis mehrtausendfacher Beschleunigung des freien Falles vergleichen. Benutzt wurde für unseren Trennungsgang eine Flaschenzentrifuge, der einfachste Typ einer Vollmantelzentrifuge.

An einer rotierenden, senkrecht gelagerten Welle sind symmetrisch 4 Behälter pendelnd aufgehängt. Die Behälter dienen zur Aufnahme von Zentrifugengläsern von 100 ml Rauminhalt. Die Anordnung der Behälter ist so, dass unter dem Einfluss der Zentrifugalkraft die Behälterachse senkrecht zur Rotationsachse steht.

Das heisst: Die Achse des Gravitationsfeldes deckt sich mit der Achse des Zentrifugenglases, was eine Erfüllung der ersten Bedingung unserer Versuchsanordnung ist.

Durchmesser der Zentrifugengläser: 32 mm

Drehzahlen der Zentrifuge: 1000 - 8000 U/min

Methodisch decken sich Sedimentation und Zentrifugieren in ihrem Anwendungsreich zum grossen Teil. Es hängt jeweils vom Verhalten des zu bearbeitenden Stoffes ab, welche Methode anwendbar ist.

2. Theorie der Sedimentation.

Auf ein frei fallendes Massenteilchen in ruhendem flüssigem Medium wirken folgende Kräfte:

Gewicht $G \longrightarrow$ abwärts

Auftrieb $A \longrightarrow$ aufwärts

Strömungswiderstand $W \longrightarrow$ aufwärts

Von einer Anfangsgeschwindigkeit 0 wird sich das Massenteilchen beim Fall zunächst beschleunigt bis zu einer Geschwindigkeit $\bar{w}_0$ bei der ein Gleichgewicht zwischen den genannten Kräften auftritt.

$$G9. \quad W = G - A = V \cdot (\gamma - \gamma_F)$$

Definition der Symbole

V = Volumen

γ = spez. Gewicht des umgebenden Mediums

γ_F = spez. Gewicht des Massenteilchens.

Die Beschleunigung ist von diesem Moment an gleich 0 und die Fallgeschwindigkeit konstant $\bar{w}$. Wenn man voraussetzt, dass Erythrocyten, Leukocyten oder Carcinomzellen in ihrer Struktur einem kugelförmigen Massenteilchen gestaltlich nahekommen, so lassen sich folgende Beziehungen innerhalb unserer Versuchsbedingungen für den Bereich der laminaren Strömung aufstellen:

$$G10. \quad \bar{w}_{\text{lam}} = \frac{d^2 \cdot g \cdot \frac{\gamma}{\gamma_F} - 1}{18 \nu} \quad \left[\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1} \right]$$

Definition der Symbole (Dimensionen im CGS-System)

$d [\text{cm}]$ = Zelldurchmesser

$\gamma : \gamma_F \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]$ = spez. Gewicht der Medien und Massenteilchen

$g [\text{cm} \cdot \text{sec}^{-2}]$ = Schwerebeschleunigung

$\nu \left[\frac{\text{cm}^2}{\text{sec}} \right]$ = relative Zähigkeit

Die Geschwindigkeit ändert sich mit dem Quadrat des Durchmessers der Massenteilchen bei laminarer Strömung. Im Grössenbereich unserer Versuchsbedingungen spielt diese Beziehung nur eine geringe Rolle. Bei etwas grosseren Dimensionen der Massenteilchen ist dagegen die Empfindlichkeit auf Teilchengrösse sehr gross.

Für die turbulente Strömung ergeben sich folgende Gesetzmässigkeiten:

Den Gesamtwiderstand W bezieht man auf die dargebotene Fläche F (grösster Körperquerschnitt senkrecht zur Bewegungsrichtung.) und auf den Staudruck:

$$\gamma \cdot \frac{w^2}{2g}$$

$$G11. \quad W = c \cdot F \cdot \frac{\gamma \cdot w^2}{2g}$$

wobei c eine dimensionslose Widerstandszahl ist, die von der Reynolds'schen Zahl abhängig ist. (Werte bei Turbulenz je nach Gestalt des umströmten Körpers von 0,5 - 1,35)

Aus den Formeln G9 und G11 lassen sich Beziehungen für die Senkungsgeschwindigkeit bei Turbulenz ableiten.

$$G12. \quad \bar{w}_{\text{turb}} = \left[\frac{4 \cdot g}{3 \cdot c} \cdot \left(\frac{\gamma}{\gamma_F} - 1 \right) \cdot d \right]^{\frac{1}{2}}$$

Aus Gleichung G12 ergibt sich für den Bereich der turbulenten Strömung eine weit-aus geringere Bedeutung der Teilchengrösse als bei laminarer Strömung. Da unsere Zentrifuge sehr schnell ihre konstante Endgeschwindigkeit erreicht, liegt unser Arbeitsbereich zum grössten Teil im Bereich turbulenter Strömung. Dadurch wird eine weitgehende Übereinstimmung der Versuchsbedingungen mit den theoretischen Forderungen erzielt.

3. Theorie des Zentrifugierens.

Auf ein Teilchen der Masse m , das sich mit der Bahngeschwindigkeit v auf einem Kreis mit dem Radius r bewegt, wirkt die Zentrifugalkraft P .

$$G13. \quad P_{\text{Zentr.}} = m \cdot r \cdot \omega^2 = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad [\text{kg}]$$

Definition der Symbole	
$\omega = 2\pi \frac{n}{60} [\text{sec}^{-2}]$	= Winkelgeschwindigkeit
$n; [U/\text{min}]$	= Umdrehungszahl
$r; [\text{cm}]$	= Trommeldurchmesser

Üblicherweise gibt man das Verhältnis der Zentrifugalkraft zum Gewicht als Beschleunigungsverhältnis Z an. Dies ist gleichzeitig die Kennzahl der Zentrifuge.

$$G14. \quad Z = \frac{P_2}{G} = \frac{r \cdot \omega^2}{g} = \frac{r \cdot n^2}{900}$$

Man kann daraus ersehen, dass eine Erhöhung der Drehzahl n einen weitaus grösseren Einfluss auf das Trennvermögen einer Zentrifuge hat, als Variationen des Trommeldurchmessers.

Für unsere spezielle Versuchsanordnung ist folgendes wichtig:

Die Intervalle im spezifischen Gewicht unseres Trennmediums sind sehr klein abgestuft. Sie müssen aber absolut signifikant bleiben. Käme es nun beim Zentrifugieren zu Schwankungen in der Umdrehungszahl, so würde das einen Verlust der Signifikanz zwischen den einzelnen Trennstufen zur Folge haben. Aus diesem Grunde muss also die Konstanz der Umdrehungszahl unserer Zentrifuge absolut gewahrt werden. Neben der Drehzahl der Zentrifuge sind noch 2 weitere Faktoren massgebend für die Trennleistung:

- Verweilzeit für den Trennvorgang
- Art der Flüssigkeitsführung.

Die Abtrennung eines Flüssigkeits- oder Massenteils lässt sich ähnlich wie beim Sedimentiervorgang rechnerisch erfassen. Anstelle der Fallbeschleunigung setzt man den Begriff der Zentrifugalbeschleunigung. Die Absetzgeschwindigkeit unter dem Einfluss der Zentrifugalbeschleunigung ist dann:

$$G15. \quad w_z = \frac{d^2}{18 \eta_{Fl}} \cdot \frac{\gamma_t - \gamma_{Fl}}{\gamma_{Fl}} \cdot r \cdot \omega^2 \quad [\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}]$$

Definition der Symbole	
$\eta_{Fl} [\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}]$	= relative Zähigkeit d , Trennmittels
$\gamma_t [g \cdot \text{cm}^{-3}]$	= spez. Gew. der Zellteilchen
$\gamma_{Fl} [g \cdot \text{cm}^{-3}]$	= spez. Gew. des Trennmittels
$d [\text{cm}]$	= Teilchendurchmesser

Im Einklang mit der Erfahrung zeigt die Gleichung G15, dass der Trennvorgang ausser durch Variation der Beschleunigung, durch Veränderung des Teilchendurchmessers (z.B. durch Agglomeration) oder durch Arbeit bei höherer Temperatur zur Herabsetzung der Zähigkeit des Trennmittels erheblich beeinflussbar ist. Auch hieraus leiten sich zwei Faktoren für unsere Versuchsbedingungen ab:

1. Arbeiten bei einer sinnvollen konstanten Temperatur (20°C) zur Vermeidung eines neuen Versuchsparameters.
2. Ausnutzen der Temperaturabhängigkeit des Trennmediums beim Dekantieren. Es besteht dabei die Möglichkeit, das Trennmittel einzufrieren, wodurch ein Einbruch der Oberfläche beim Absaugen vermieden wird.

C. PRINZIP DER FLOTATION.

Bei der Silikon - Flotation handelt es sich um einen Trennvorgang Flüssig - Flüssig - Fest. Stoffe, die schwerer sind als das Trennmedium, sinken ab, während die spezifisch leichteren sich an der Oberfläche des Trennmediums ablageren. Durch Wahl des Suspensionsmittels (PVP : polyvinyl - pyrrolidin.) erreicht man, dass die sich an der Oberfläche ablagernden Teilchen einen monoionaren, wasserabweisenden Film bilden. Man erklärt sich sein Entstehen in folgender Form: Massenteilchen, in unserem Falle Zellen, adsorbieren Ionen unter Vermittlung von Restvalenzen und Van der Waals'scher Kräfte. Bringt man Massenteilchen in eine Lösung, die auf sie ansprechende Ionen enthält, so reichern sich diese an der Grenzfläche fest/flüssig an.

Ist die Konzentration der Ionen einer Lösung nur gering, so lagern sich diese horizontal über der Grenzfläche zerstreut an. Bei steigender Konzentration und damit dichter werdender Ansammlung an der Grenzfläche richten sie sich mehr und mehr auf und bilden einen kondensierten Adsorptionsfilm, der aus steil zur Grenzfläche aufgerichteten, parallel zueinander liegenden Ionen besteht.

z.B. Bei geradkettigen $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ Homologen nimmt jedes Ionen eine Fläche von $21,0 \text{ \AA}^2$ ein, welches der Querschnitt der CH_3 -Gruppe ist.

Es ist bewiesen, dass es sich bei diesen Vorgängen um eine reine Adsorption unter Betätigung der Van der Waals'schen Kräfte und elektrostatischer Kräfte handelt und nicht um eine chemische Bindung. (Siedler, Ph.)

Nach diesen Erörterungen über die Wahl der Suspensionsflüssigkeit folgen einige Betrachtungen über die Eigenschaften des Trennmediums Silicon. Silicone sind hydrophob und chemisch inaktiv. Sie haben eine relativ hohe Grenzflächen- spannung. Die Einheit dieser Grösse ist $[\text{dyn/cm}]$; man kann sie in Beziehung zur Oberflächenenergie pro Flächeneinheit setzen. Die Dimension dieser Grösse ist $[\text{erg/cm}^2]$.

(Bayer gibt für das Silicon PH 300 eine Oberflächenspannung von $24,2 [\text{dyn/cm}]$ an.) Dieses Mass ist numerisch gleich der aufgewendeten mechanischen Arbeit, die notwendig ist, um einen Zusammenhang der Oberfläche zu erhalten. Rechnet man

noch die Haftfähigkeit zwischen den einzelnen Massenteilchen bzw. Zellverbänden hinzu, so kann man den Energiebereich abgrenzen, in dem eine sinnvolle Einhaltung der Versuchsbedingungen gewährleistet ist.

Aus diesen Überlegungen folgt also die Wahl der Umdrehungszahl unserer Zentrifuge und damit der Energieanteil, der pro Oberflächenanteil wirksam ist.

D. KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER VERSUCHSBEDINGUNGEN.

1. Bedingungen für die Wahl der Medien.

- a) Die Suspensionsflüssigkeit muss eine geringe ionale Konzentration aufweisen, um chemische und osmotische Veränderungen an den Zellen zu vermeiden.
- b) Das Trennmedium muss chemisch inaktiv sein; im spez. Gewicht zwischen den Gewichten der zu trennenden Substanzen liegen.
Die Silicone müssen mischbar sein.
Geringe Temperaturschwankungen während des Versuchs dürfen nicht zu einer wesentlichen Veränderung der Viskosität und des spez. Gewichtes des Trennmediums führen.

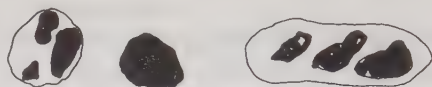
2. Bedingungen beim Zentrifugieren.

- a) Die Achse des Gravitationsfeldes muss sich mit der Achse des Zentrifugenglases decken; daher keine Winkelzentrifuge.
- b) Die konstante Endumdrehungszahl der Zentrifuge soll sehr schnell erreicht werden.
- c) Schwankungen in der Umdrehungszahl während des Versuchs müssen vermieden werden.
- d) Das Gravitationsfeld muss grösser sein als die Kräfte, welche die Zellen im Verband halten.
- e) Trotz hoher Umdrehungszahl sollen nur geringe Mengen Wasser zwischen Zellen und Medium diffundieren.
- f) Der Radius des Zentrifugenglases soll möglichst klein sein. Die Länge des Glases ist von geringem Einfluss auf das Trennvermögen.
- g) Die Verweildauer für den Trennungsgang muss konstant sein.

E. AUSWERTUNG DER VERSUCHE.

Wir unterteilten bei der Auswertung die auftretenden Tumorzellen in 3 Zelltypen.

1. Tumorzellen mit hyperchromen, kompakten Zellkernen.



2. Tumorzellen mit aufgelockertem, polychromatischen Kern und vorhandenem Plasmasaum.



3. Polychromatische Zellkerne ohne Plasmasaum.



Bei der Auswertung wurden Direktabstriche des jeweiligen Tumormaterials zum Vergleich herangezogen. Carcinomverdächtige Zellen, deren Diagnose aber nicht genügend sicher gestellt werden konnte, wurden als "fragliche Zellen" mitgezählt. In der Gesamtzahl der ausgezählten Tumorzellen wurden sie nicht aufgeführt.

Versuchskritik:

Um eine sinnvolle Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, folgen einige Betrachtungen über die Fehlerquellen, die Einfluss auf die Signifikanz dieser Ergebnisse haben können.

Fehler durch die Methode:

Hierbei sind es hauptsächlich Zellverluste beim Absaugen des Sedimentes aus dem Zentrifugenglas, die das Zahlenergebnis auf den Filtern verändern können. Weitere Fehlermöglichkeiten der Versuchsmethode wurden bereits im theoretischen Teil der Arbeit erwähnt.

Fehler beim Auswerten:

Zu den subjektiven Zählfehlern, die bei jeder mikroskopischen Auszählung möglich sind, treten Schwierigkeiten durch unterschiedliche Dichte der Zellsammlungen auf den einzelnen Filtern hinzu. Aus diesem Grunde wurden Zellhaufen vernachlässigt, bei denen zwar Verdacht auf Malignität bestand, die aber

nicht klar auszählbar waren.

Es wurde jeweils ein Viertel eines Filters ausgezählt, und die gefundenen Zahlen mit 4 multipliziert. Filter, auf denen nur relativ wenige Zellen zu finden waren, wurden ganz ausgezählt.

Die angegebenen Zahlen in unseren Tabellen resultieren aus exakten Zählwerten zwischen 1000 und 10000 Zellen, die pro Filter gefunden wurden. Wir setzten eine Fehlerbreite für die angegebenen Werte von + 2% fest.

Bezeichnung der einzelnen Kurven:

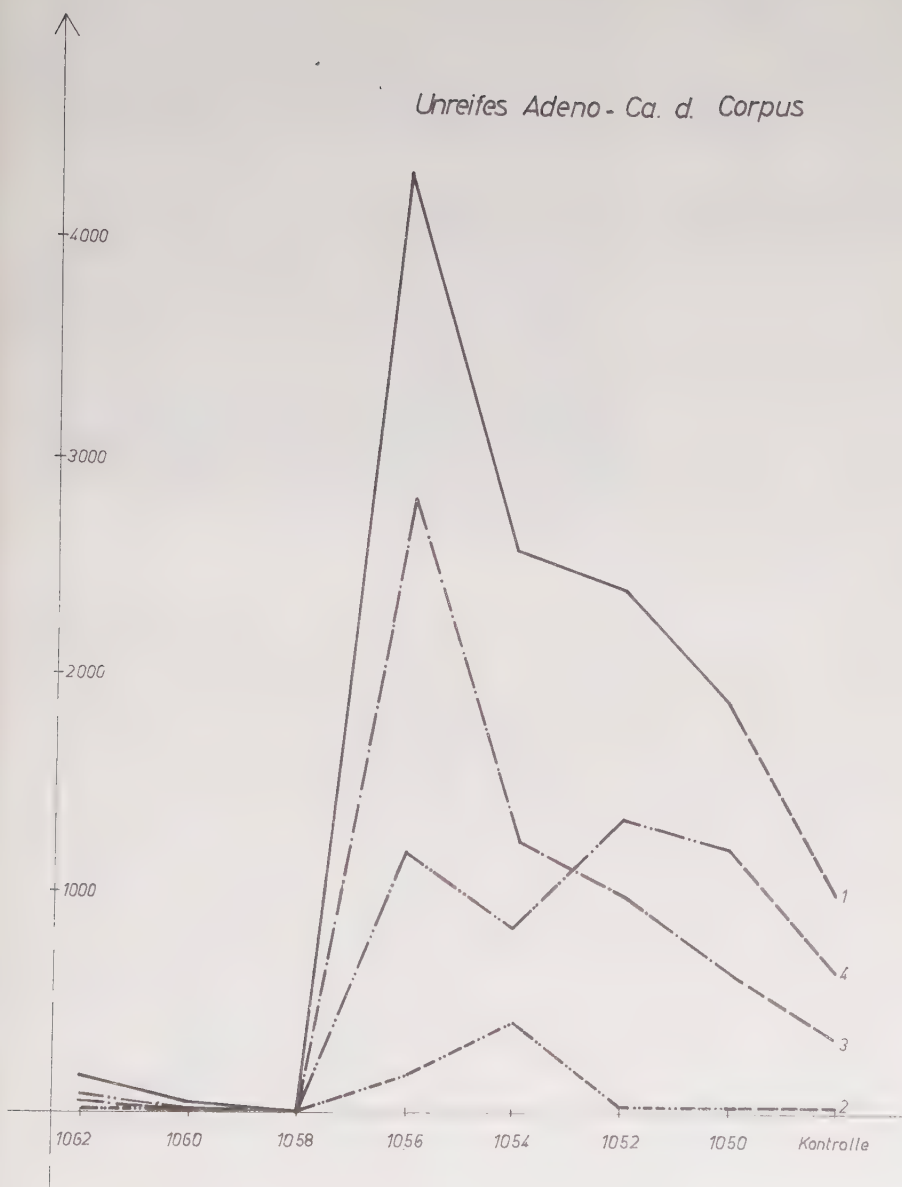
Die Beschriftung aller Kurven ist einheitlich.

1. Gesamtzahl der Tumorzellen
2. Tumorzellen mit kompakten, hyperchromen Kernen
3. Tumorzellen mit aufgelockerten, polychromen Kernen.
4. Polychromatische Tumorzellkerne ohne Plasmarand.

UNREIFES ADENO - CARCINOM DES CORPUS UTERI.

Beginn der Streuung:	bei spez. Gewicht 1058
Maximum:	bei spez. Gewicht 1056 mit 34 % aller gefundenen Tumorzellen.
Weiterer Kurvenverlauf:	Flacherer Verlauf der Verteilungskurve als beim Anstieg, wobei in der Kontrolle des letzten Trennungsganges noch 7, 9 % aller Zellen gefunden wurden. Diese sind leichter als 1050.
Zelltyp, der das Bild des Kurvenverlaufs bestimmt:	Der vorherrschende Zelltyp sind Tumorzellen mit aufgelockerten, polychromatischen Kernen und schmalem Plasmasaum. Das Maximum in der Streuungskurve dieses Zelltyps fällt mit dem Maximum der Gesamtverteilung zusammen. An zweiter Stelle folgen Tumorzellen mit hyperchromen, kompakten Zellkernen. Die Zellen besitzen einen oder mehrere Kerne. Ihre Verteilungskurve erreicht das Maximum bei S.G. 1052. Polychromatische Zellkerne ohne Plasmasaum folgen an dritter Stelle mit einem Verteilungsmaximum bei S.G. 1054.

Unreifes Adeno - Ca. d. Corpus



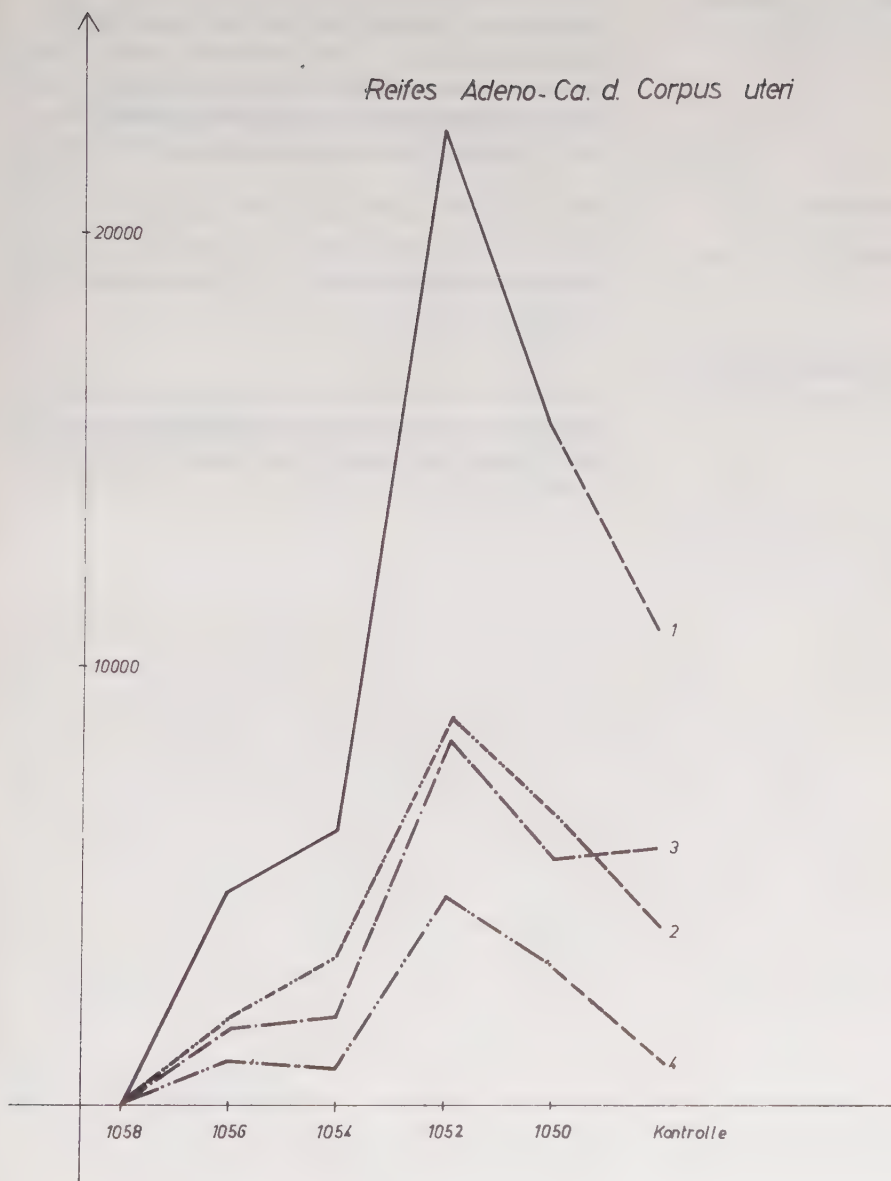
REIFES ADENO - CARCINOM DES CORPUS UTERI.

Beginn der Streuung:	bei S.G. 1056
Maximum:	bei S.G. 1052 mit 37 % aller diagnostizierten Zellen.
Weiterer Kurvenverlauf:	bei S.G. 1050 treten 26 % aller Zellen auf, während 18,3 % der gesamten Zellen leichter als 1050 sind.

Zelltyp, der das Bild des

Kurvenverlaufes bestimmt: Anders als beim unreifen Adeno - Carcinom des Corpus bestimmen hier grossblasige, polychrome Tumorzellkerne ohne Plasmaum den Verlauf der Verteilungskurve. Zahlenmässig nur etwas geringer folgen an zweiter Stelle Tumorzellen mit polychromatischen Kernen. Die Maximalwerte beider Zellarten liegen bei 1052, dem Maximalwert der Gesamtverteilung. Tumorzellen mit kompakten, hyperchromen Zellkernen erscheinen an letzter Stelle und erreichen einen Höchstwert in der Verteilung bei S.G. 1052.

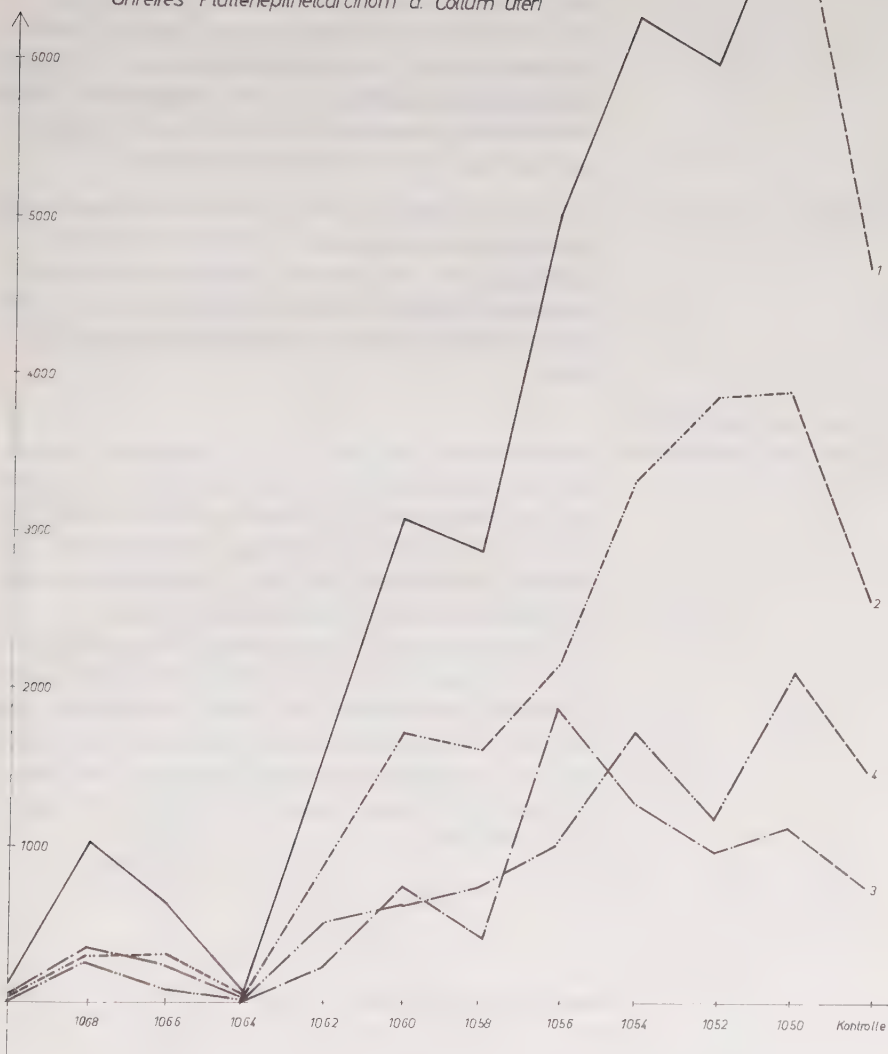
Reifes Adeno-Ca. d. Corpus uteri



UNREIFES PLATTENEPITHELCARCINOM DES COLLUM UTERI.

Beginn der Streuung:	Eine signifikante Anzahl von Tumorzellen tritt bei einem spez. Gewicht von 1062 auf. Schon bei S.G. 1068 findet man 2,6 % der gesamten Zellen; es ist dies aber sicher auf einen Fehler innerhalb des Versuches zurückzuführen. Ausserdem liegt dieser Wert nur 0,6 % über der von uns angegebenen Fehlerbreite.
Maximum:	bei S.G. 1050 mit nur 18,7 % aller Zellen.
Sonstiger Kurvenverlauf:	Die Streubreite der Zellen des unreifen Plattenepithelcarcinoms ist relativ gross; 12,1 % der gesamten Zellen sind leichter als 1050.
Zelltyp, der das Bild des Kurvenverlaufs bestimmt:	Polychromatische Tumorzellkerne ohne Plasmasaum überwiegen; Tumorzellen mit kompakten, hyperchromen Kernen und Zellen mit aufgelockerten, polychromatischen Kernen folgen.

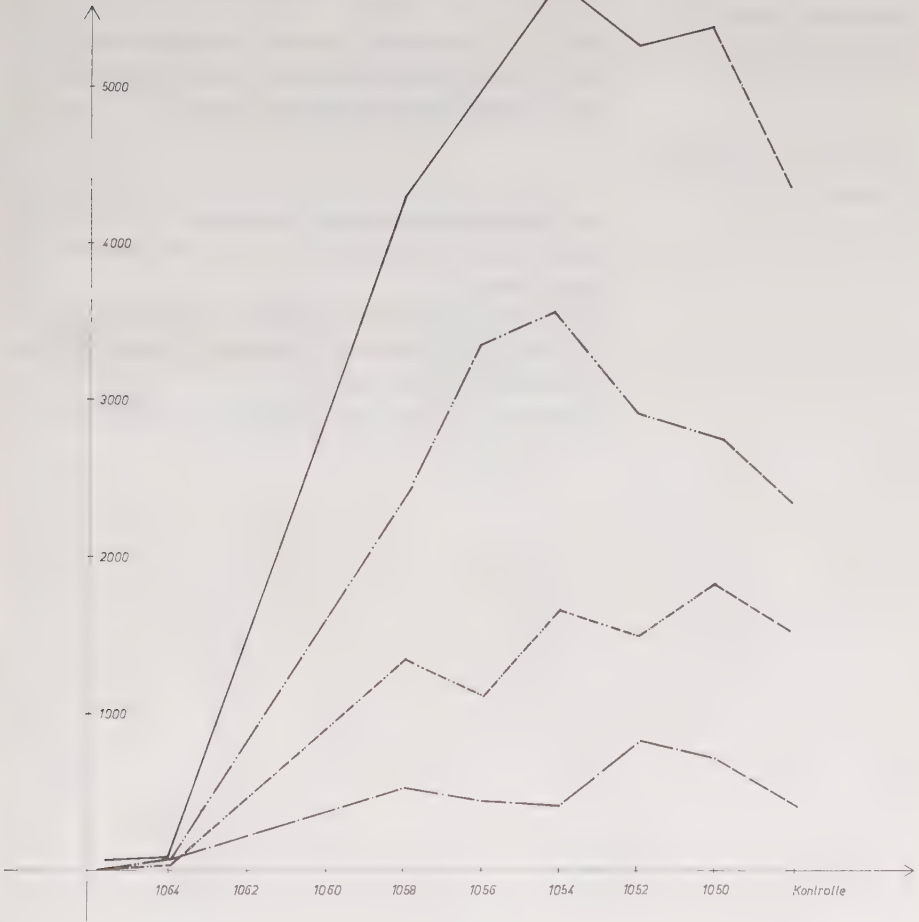
Unreifes Plattenepithelcarcinom d. Collum uteri



MITTELREIFES PLATTENEPITHELCARCINOM DES COLLUM UTERI.

Beginn der Streuung:	bei S.G. 1062.
Maximum:	bei S.G. 1054 mit 18,6 % aller ausgezählten Zellen Dieser Maximalwert unterscheidet sich aber kaum von den Werten, die bei S.G. 1056 (16,3 %) und bei S.G. 1052 (17,3 %) sowie bei S.G. 1050 (17,6 %) gefunden werden. Da diese Werte mit ihren Intervall-differenzen innerhalb der von uns festgesetzten Fehlerbreite liegen, bezeichnen wir den von uns angegebenen Maximalwert als relatives Maximum.
Sonstiger Kurvenverlauf:	Ähnlich wie bei der unreifen Form des Plattenepithelcarcinoms ist auch bei der mittelreifen Form die Streuung gross. Vier relative Höchstwerte der Streuungskurve prägen ihren flachen Verlauf; noch 14,3 % aller gezählten Tumorzellen sind leichter als S.G. 1050.
Zelltyp, der das Bild des Kurvenverlaufs bestimmt:	Gegenüber der unreifen Form des Carcinoms bestimmen bei der mittelreifen Form weitgehend Tumorzellen mit kompakten, hyperchromatischen Kernen das Bild. Die Variabilität der Form, der Kerngrösse, der Anzahl der Kerne und des Kern - Plasmaverhältnisses war innerhalb dieser Zellgruppe sehr gross. Das Maximum der Streuung dieses Zelltyps liegt bei S.G. 1054 und deckt sich mit dem Maximalwert der Gesamtverteilungskurve. In zweiter Linie folgen polychrome Tumorzellkerne ohne Plasmasaum und Tumorzellen mit polychromatischen, aufgelockerten Zellkernen, deren Streuungsmaxima bei S.G. 1052 bzw. S.G. 1050 liegen.

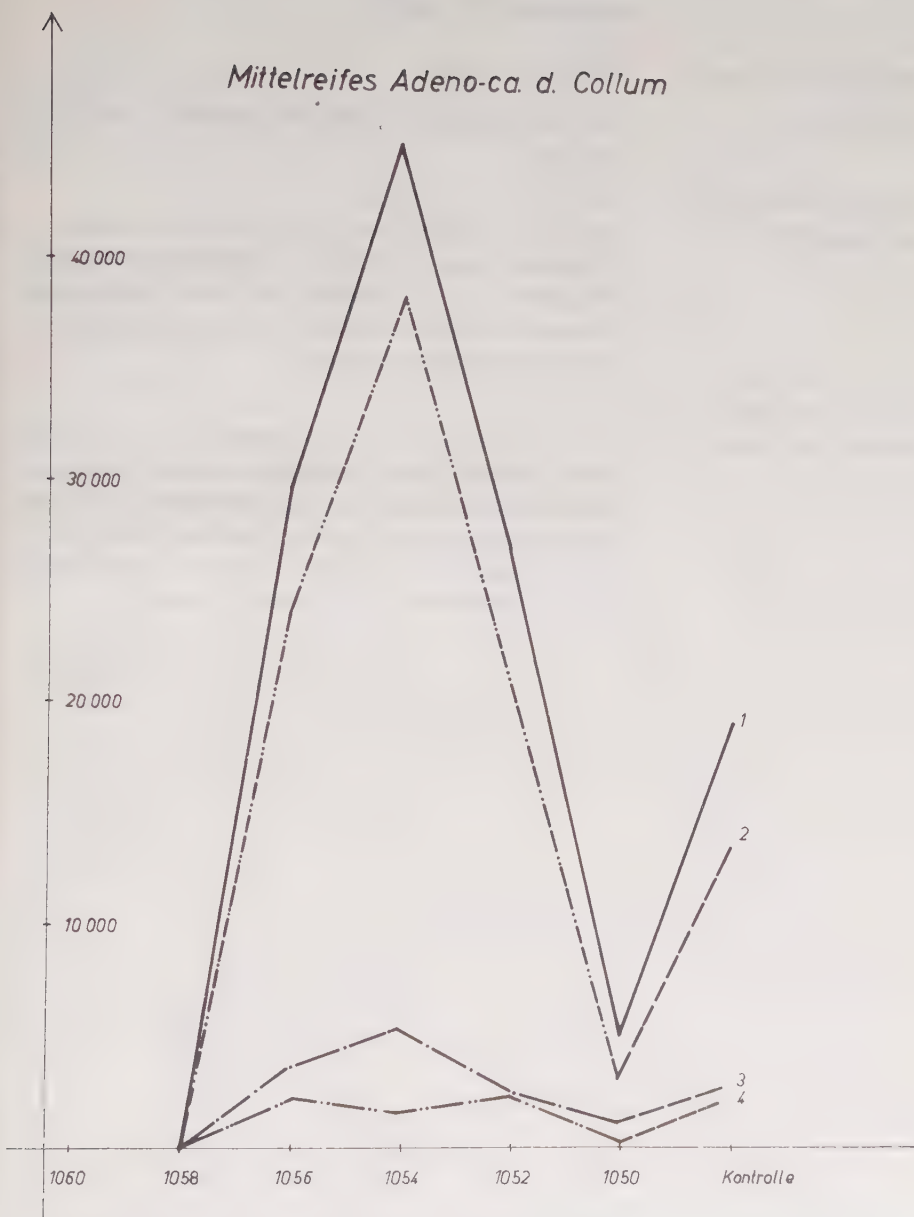
Mittelreifes Plattenepithelcarcinom d. Collum uteri



MITTELREIFES ADENO - CARCINOM DES COLLUM.

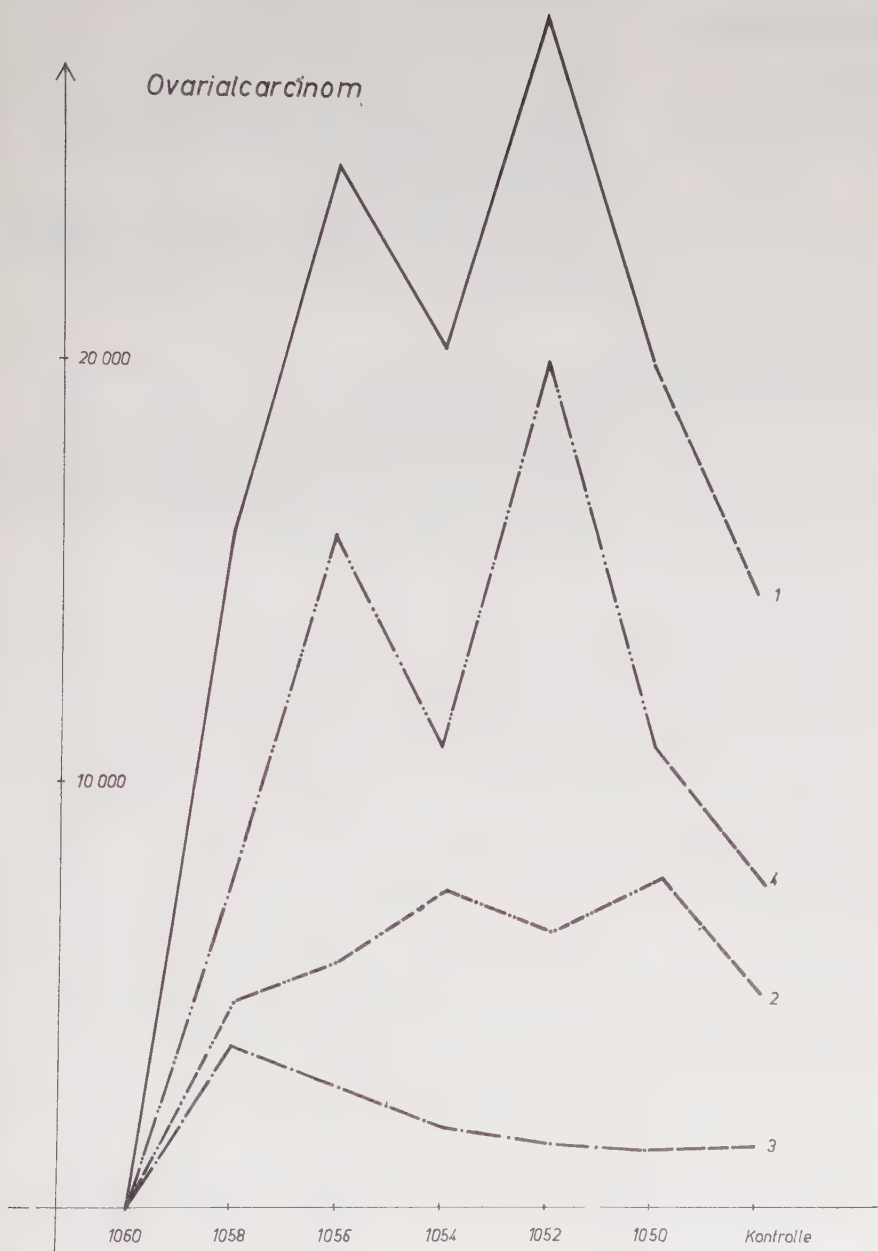
Beginn der Streuung:	bei S.G. 1058
Maximum:	bei S.G. 1054 mit 35,2 % aller Tumorzellen, die bei dem Versuch ausgezählt wurden.
Sonstiger Verlauf der Streubreite:	bei S.G. 1056 treten 23 % der Tumorzellen auf, 3,9 % finden wir bei 1050, und 14,6 % sind leichter als 1050 in ihrem spezifischen Gewicht.
Zelltyp, der den Kurvenverlauf bestimmt:	Vorherrschender Zelltyp sind grossblasige, polychrome Tumorzellkerne ohne Plasmasaum, deren Verteilungskurve geometrisch ähnlich der Gesamtverteilungskurve verläuft. An zweiter Stelle finden wir Tumorzellen mit aufgelockerten, polychromen Zellkernen, die von einem Plasmarand umgeben sind. Gering ist die Zahl der Carcinomzellen mit hyperchromatischen, kompakten Kernen.

Mittelreifes Adeno-ca. d. Collum



OVARIALCARCINOM: (PAPILLÄR-ALVEOLÄRES ADENOCARCINOM;
KONGLOMERATTUMOR.)

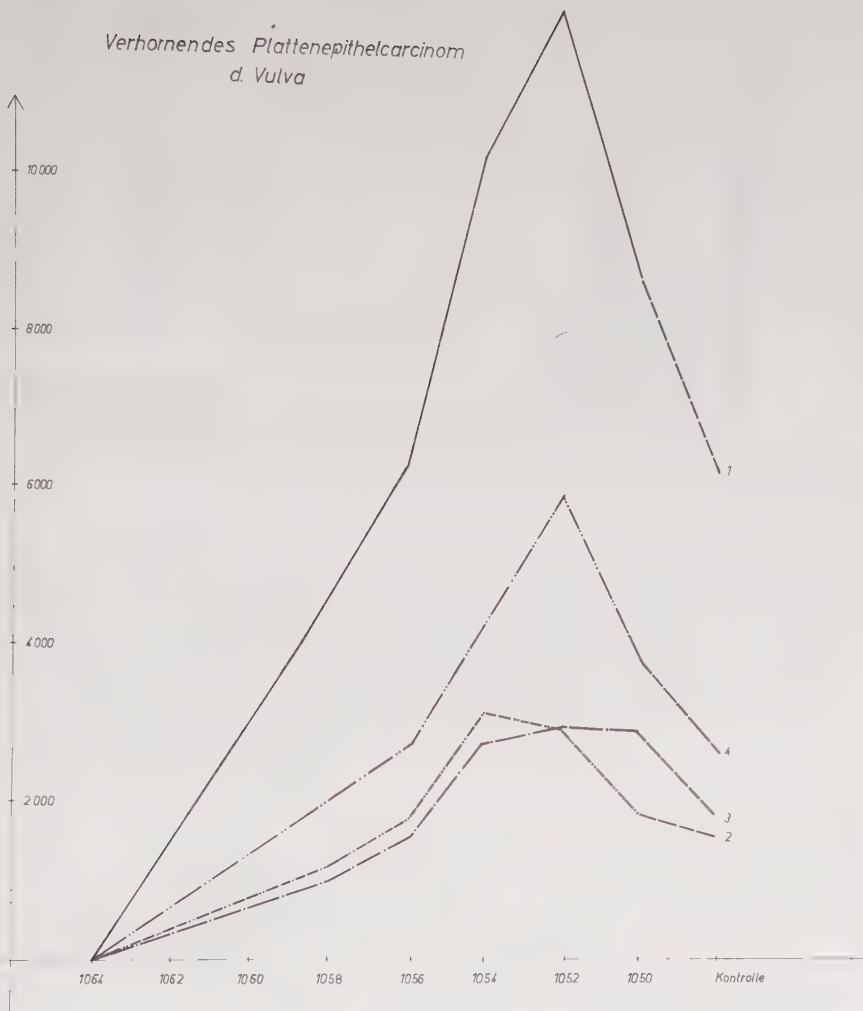
Beginn der Streuung:	bei S.G. 1060
Maximum:	bei S.G. 1052 mit 22,8 % der gesamten Carcinomzellen
Sonstiger Verlauf der Streuungskurve:	Die Kurve verläuft zweigipflig mit einem ersten Höchstwert von 19,75 % aller Zellen bei einem spezifischen Gewicht von 1056; 16,3 % der Tumorzellen finden wir bei S.G. 1054; 11,7 % aller gezählten Zellen sind leichter als 1050.
Zelltyp, der den Kurvenverlauf bestimmt:	Die Verteilungskurve der Tumorzellen mit kompakten hyperchromen Kernen entspricht in ihrem Verlauf der Gesamtverteilungskurve. Tumorzellkerne, polychrom und ohne Plasmarand treten als nächster Zelltyp in Erscheinung. An letzter Stelle folgen Carcinomzellen mit aufgelockerten, polychromen Kernen.

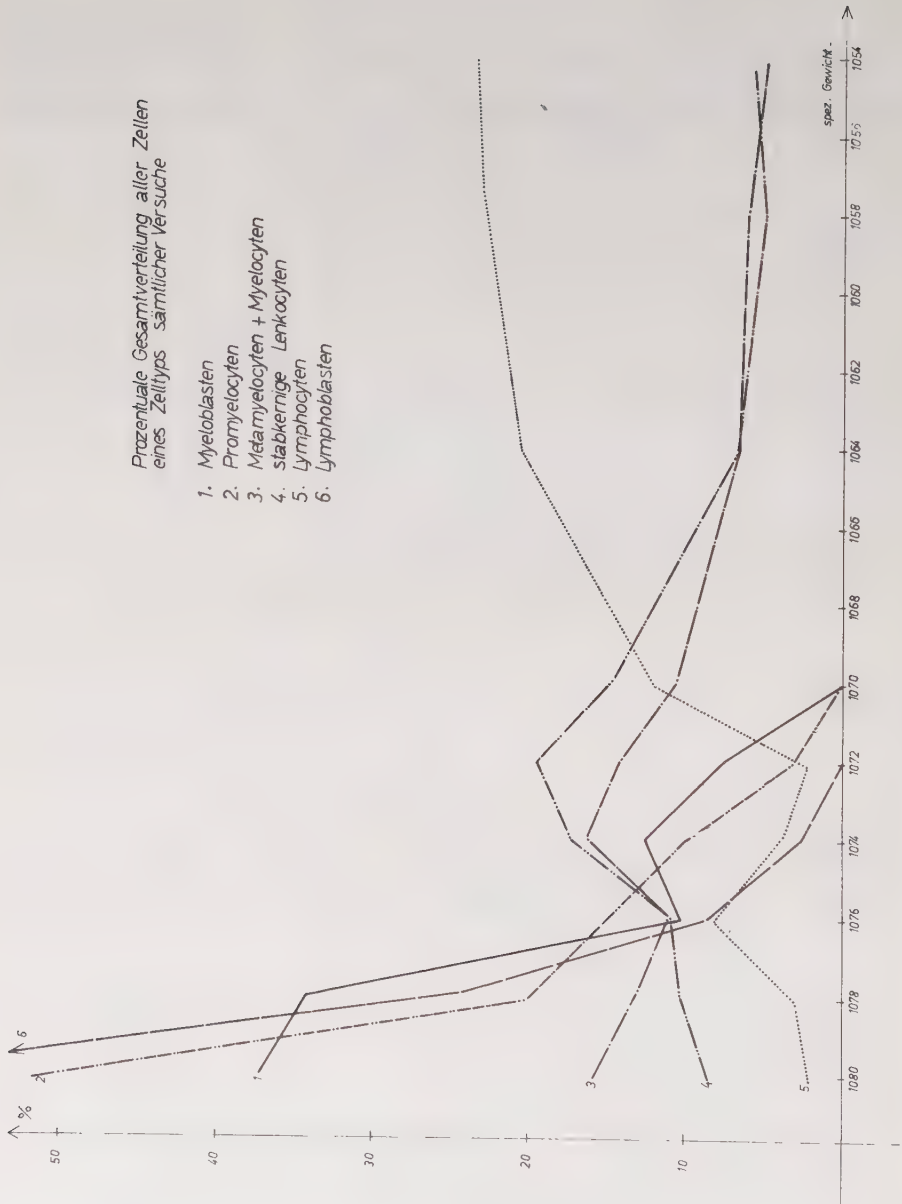


VERHORNENDES PLATTENEPITHEL-CARCINOM DER VULVA.

- Beginn der Streuung: bei einem spez. Gewicht von 1062.
- Maximum: bei S.G. 1052 mit 25 % aller ausgezählten Zellen.
- Weiterer Kurvenverlauf: Wie bei den beiden anderen Formen des Plattenepithelcarcinoms ist auch beim verhornenden Typus die Streuungsbreite sehr gross.
Bei S.G. 1054 finden wir 21 % und bei S.G. 1050 18,2 % aller diagnostizierten Zellen. Noch 13 % der ausgezählten Tumorzellen waren leichter als S.G. 1050.
- Zelltyp, der das Bild des Kurvenverlaufs bestimmt: Noch stärker als bei der mittelreifen Form des Plattenepithelcarcinoms treten bei der verhornenden Form Zellen mit kompakten, hyperchromen Kernen in den Vordergrund. Polychromatische Tumorzellkerne mit und ohne Plasmasaum stehen bei annähernd gleicher Verteilung an zweiter Stelle.

Verhornendes ^{*}Plattenepithelcarcinom
d. Vulva





F. DISKUSSION DER ERGEBNISSE.

Betrachtet man die Ergebnisse aller von uns bearbeiteten Genitalcarcinome, so lässt sich allgemein folgendes feststellen:

1. Alle Carcinome liegen mit ihrem spezifischen Gewicht innerhalb einer abgrenzbaren Streubreite. (1064 - 1050 und leichter.)
2. Eine spezielle Zuordnung eines spezifischen Gewichtes zu bestimmten Carcinomen nach dem Gesichtspunkt der Lokalisation war nicht möglich.
3. Eine Differenzierung nach dem spezifischen Gewicht der Carcinomzellen auf Grund des verschiedenen histologischen Baus bzw. Reifungsgrades des jeweiligen Carcinoms konnte beobachtet werden.
4. Um eine allgemeingültige Hypothese aufzustellen, reicht die Zahl der bearbeiteten Fälle nicht aus; es handelt sich also in folgender Interpretation der Ergebnisse nur um eine spezielle Arbeitshypothese.

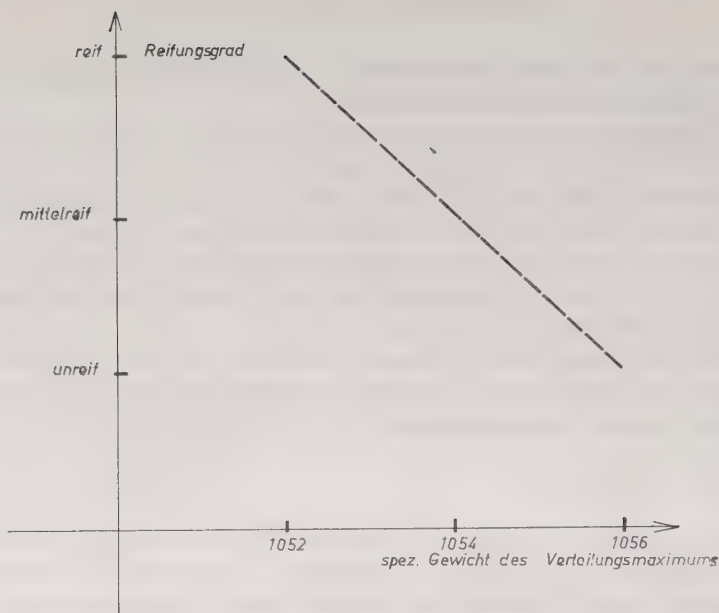
I. ADENO - CARCINOM.

Für die Zellen des Adeno - Carcinoms fanden wir unabhängig von der jeweiligen Lokalisation des Carcinoms eine spezielle Zuordnung der verschiedenen Reifungsgrade zu einem bestimmten spezifischen Gewicht. Die Streubreite der einzelnen Zelltypen des Adeno-Carcinoms war relativ gering.

Mit einem spezifischen Gewicht von 1056 für das Verteilungsmaximum war die unreife Form dieses Carcinoms am schwersten; das spezifische Gewicht des reifen Adeno - Carcinoms lag mit seinem Streuungsmaximum bei 1052. Parallel zur Abnahme des spezifischen Gewichtes mit zunehmendem Reifungsgrad fanden wir eine Verschiebung der Kern - Plasmarelation zu Gunsten des Kerns.

Diese Beobachtungen lassen sich am besten in der folgenden Tabelle zusammenfassen.

Reifungs- grad	Vorherrschender Zelltyp	Maximum d. Gesamtvert.	Streuungs- breite	Zellen, leicht- er als 1050
unreif	Tu.-Zellen mit poly- chromen Kernen u. Plasmarand.	1056 34 %	1058-1050	7,9 %
mittelreif	Polychrome Zellkerne ohne Plas- masaum	1054 35,2 %	1058-1050	14,6 %
reif	Polychrome Zellkerne ohne Plas- masaum	1052 37 %	1056-1050	18,3 %



II. PLATTENEPITHEL-CARCINOM.

Vergleicht man die Gesamtverteilungskurven der Zellen in der graphischen Darstellung, so fällt auf, dass alle Verteilungskurven der bearbeiteten Plattenepithelcarcinome

1. über einen relativ grossen Streuungsbereich verlaufen,
2. im Verhältnis zu den anderen Kurven flach ansteigen und keinen absolut sicheren Maximalwert besitzen, den man einem bestimmten spez. Gewicht zuordnen könnte.

Die Streubreite des spezifischen Gewichtes reicht für die einzelnen Formen des Plattenepithelcarcinoms von S.G. 1064 bis S.G. 1050, wobei noch eine grosse Anzahl von Tumorzellen leichter als 1050 ist. Unabhängig von der Lokalisation der einzelnen Plattenepithelcarcinome - bearbeitet wurden zwei Collum - carcinome und ein Vulvacarcinom - fanden wir aber eine Gesetzmässigkeit in der Streuung der einzelnen Zellen, die dem jeweiligen Reifungsgrad und dem Aufbau der Carcinomzellen zugeordnet werden kann:

der Anstieg der einzelnen Verteilungskurven ist verschieden; hierbei verläuft die Verteilungskurve für das unreife Plattenepithelcarcinom am flachsten, während die Streuungskurve des verhornenden Plattenepithelcarcinoms relativ steil ansteigt und ein definierbares Streuungsmaximum erreicht.

Parallel dazu finden wir im cytologischen Bild eine Zunahme im Chromatingehalt des Kernes bei den das Bild beherrschenden Zelltypen.

Bei der unreifen Form des Carcinoms stehen polychromatische, aufgelockerte Tu-

morzellkerne im Vordergrund; bestimmend für den Verlauf der Verteilungskurve des mittelreifen Carcinoms sind Tumorzellen mit kompakten, hyperchromen Zellkernen, während bei dem verhornenden Plattenepithelcarcinom hyperchrome, kompakte, sehr intensiv dunkel gefärbte Zellkerne das Bild beherrschen. Bei der letzteren Form finden wir dann auch ein definierbares Maximum der Streuungskurve.

In kurzer Form werden diese Beobachtungen in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Reifungs- grad	Vorherrschender Zelltyp	Maximum d. Gesamtvert.	Streuungs- breite	Zellen, leich- ter als 1050
unreif	aufgelockerte polychrome Kerne	1050 18,7 %	1062-1050	12,1 %
mittelreif	Tu.-Zellen mit kom- pakten hyperchromen Kernen	1054; 18,6 % 1056; 16,3 % 1052; 17,3 % 1050; 17,6 %	1064-1050	14,3 %
verhornend	kompakte, hyperchrome intensiv dunkle Zell- kerne	1052; 25 %	1064-1050	13 %

III. OVARIALCARCINOM. (Konglomerattumor; papillär-alveoläres Adeno-ca.)

Das cytologische Bild des von uns untersuchten Ovarialcarcinoms war sehr mannigfaltig.

Aus diesem Grunde war es schwierig, die einzelnen Zellen nach dem von uns ausgearbeiteten Schema zu gliedern.

Die Streuungsbreite der Verteilungskurve nach dem spezifischen Gewicht der einzelnen Zellen lag zwischen Plattenepithelcarcinom und Adenocarcinom. Die Streuung der Zellen beginnt bei einem spezifischen Gewicht von 1060 und erreicht ein erstes relatives Maximum bei S.G. 1056 mit 19,75 % aller ausgezählten Zellen. Mit 22,8 % aller gefundenen Carcinomzellen liegt der Höchstwert der Verteilungskurve bei S.G. 1052. Zwischen diesen beiden Werten wurden bei S.G. 1054 16,3 % der Tumorzellen gefunden. Diese Verlaufsform der Verteilungskurve - steiler Anstieg zu Beginn, flacher, zweigipfliger Verlauf im Maximalbereich - lässt sich durch die Vielgestalt der auftretenden Zellformen erklären, von denen jede durch ihr eigenes spezifisches Gewicht einen Einfluss auf die Form der Gesamtverteilungskurve gewinnt.

Im Vordergrund des Bildes stehen Tumorzellen mit hyperchromen Kernen, kompakte, intensiv dunkel gefärbte hyperchromatische Zellkerne ohne Plasmasaum. Die Verlaufsform der Verteilungskurve dieser Zelltypen deckt sich mit der Kurve der Gesamtverteilung. Polychrome, aufgelockerte Tumorzellkerne erscheinen in zweiter Linie, während Tumorzellen mit polychromen, locker gebauten Zellkernen und ausgeprägtem Plasmaraum relativ selten zu finden sind.

Bei der Vielzahl der am Ovar auftretenden Primär- und Sekundärcarcinome wäre es interessant, ein grösseres Material zu untersuchen, und so einen Überblick über das Verhalten der spezifischen Gewichte bei den einzelnen Carcinomformen des Ovars zu gewinnen.

IV. UNTERSUCHUNGEN BEI LEUKÄMISCHEM BLUT.

a) Myeloische Leukämie

b) Lymphatische Leukämie.

Für unsere Untersuchungen wurden jeweils 10 ml Blut einer Patientin mit myeloischer bzw. lymphatischer Leukämie verwendet. Das Blut war durch einige Tropfen Liquemin Roche ungerinnbar gemacht worden. Bis zu Versuchsbeginn, 1 - 2 Stunden nach Entnahme, wurde es im Eisschrank aufbewahrt. Die Blutproben für alle Versuche stammen von den gleichen Patienten. Hierbei ergab das Differentialblutbild:

bei a)	Hb	: 76 %
	Färbeindex	: 1
	Leukocyten	: 194 000
	Stabkernige	: 15 %
	Segmentkernige	: 13 %
	Promyelocyten	: 22 %
	Metamyelocyten	: 19 %
	Myelocyten	: 13 %
	Basophile	: 8 %
	Eosinophile	: 6 %
	Lymphocyten	: 3 %
bei b)	Hb	: 60 %
	Färbeindex	: 1
	Leukocyten	: 354 000
	Stabkernige	: 2 %
	Segmentkernige	: 4 %
	Lymphocyten	: 76 %
	Lymphoblasten	: 18 %

Aus den Sedimenten der einzelnen Trennungsgänge wurden Objektträgerausstriche angefertigt, luftgetrocknet und nach Pappenheim gefärbt. Insgesamt untersuchten wir 4 Blutproben bei myeloischer Leukämie und 3 Blutproben bei lymphatischer Leukämie.

a) Myeloische Leukämie.

Innerhalb der gegebenen Versuchsbedingungen ermittelten wir beim ersten Versuch folgende Streuung der Zellbestandteile nach ihrem spezifischen Gewicht:

Myeloblasten, Promyelocyten, Metamyelocyten und Myelocyten erreichten bei einem spez. Gewicht von 1076 den Nullwert ihrer Verteilung. Die Verteilung der jugendlichen stabkernigen Leukocyten erreicht bei einem spezifischen Gewicht von 1072 einen Höchstwert, während die prozentuale Streuung der Lymphocyten ihr Maximum bei 1056 besitzt.

In den drei nachfolgenden Versuchen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden, obwohl die Blutentnahmen in Zeitintervallen von jeweils 3 Tagen bei denselben Patienten vorgenommen wurden.

Myeloblasten und Promyelocyten fanden wir in den Objektträgerausstrichen aus dem Sediment der einzelnen Trennungsgänge bis zu einem spezifischen Gewicht von 1070.

Myelocyten erreichten ihren Maximalanteil am Gesamtzellmaterial bei einem spezifischen Gewicht von 1074. Noch beim vorletzten Trennungsgang (1054) betrug der Anteil der Myelocyten 16 %.

Die Verteilung der stabkernigen Leukocyten und der Lymphocyten in den drei letzten Versuchen war mit den Ergebnissen des ersten Versuches vergleichbar.

Eine einheitliche Interpretation ist durch die Zusammenfassung der Ergebnisse aller vier Versuche möglich. Wir berechneten dazu die Gesamtverteilung aller Zellen eines jeweiligen Zelltyps nach dem spez. Gewicht.

1. Myeloblasten: 37,2 % aller in den vier Versuchen ausgezählten Myeloblasten fanden wir im Sediment bei einem spezifischen Gewicht von 1080; das ist gleichzeitig der Maximalwert der Verteilungskurve, die bei S.G. 1072 noch 6,8 % aller ausgezählten Myeloblasten aufzeigt und bei S.G. 1070 ihren Nullwert erreicht.
2. Promyelocyten: Die Gesamtverteilungskurve aller diagnostizierten Promyelocyten beginnt mit 51 % dieser Zellgruppe bei S.G. 1080 und erreicht ebenfalls bei einem spezifischen Gewicht von 1070 ihren Nullwert.
3. Metamyelocyten und Myelocyten: 15 % dieser Zellgruppe fanden wir im Sediment bei S.G. 1080; bei einem spezifischen Gewicht von 1074 traten 16,5 % aller Myelocyten und Metamyelocyten auf, während bei S.G. 1058 bzw. S.G. 1054 die Werte immer noch um 6 % lagen.
4. Stabkernige Leukocyten: Ähnlich der letzten Streuungskurve verhält sich die Ge-

samtverteilungskurve der stabkernigen Leukocyten. Ihr Maximum liegt mit 19,8 % aller Zellen bei S.G. 1072; 5,7 % bzw. 5,8 % der ausgezählten stabkernigen Leukocyten fanden wir bei S.G. 1058 bzw. S.G. 1054.

5. Lymphocyten: Im Sediment des ersten Trennungsganges bei S.G. 1080 fanden wir 2,1 % aller diagnostizierten Lymphocyten. Die Maximalwerte ihrer Gesamtverteilung liegen bei S.G. 1058 mit 23,2 % aller Zellen und bei S.G. 1054 mit 23,8 %.

Zusammenfassend lassen sich aus diesen Ergebnissen folgende Schlüsse ziehen:

1. Die unreifen Zellformen wie Myeloblasten und Promyelocyten sind in ihrem spezifischen Gewicht schwerer als die übrigen Zellarten bei der myeloischen Leukämie.
2. Das spezifische Gewicht der Lymphocyten ist von allen Zellformen der myeloischen Leukämie am leichtesten.
3. Für die Gewinnung von Tumorzellen aus strömendem Blut ist folgendes wichtig: Nur ungefähr 40 % derjenigen Zellen, die differentialdiagnostisch gegenüber Carcinomzellen Schwierigkeiten bereiten, lassen sich mit einem Trennmedium von S.G. 1075 eliminieren.

b) Lymphatische Leukämie.

In drei übereinstimmenden Versuchen konnten wir feststellen, dass Erythroblasten und Lymphoblasten schwerer als 1074 in ihrem spezifischen Gewicht waren.

Von diesem Wert an traten in unseren Kontrollausstrichen nur noch Lymphocyten auf.

Versuchskritik.

1. Die Verteilungskurven für Zellen im jeweiligen pathologischen Blutbild können nur als Teilergebnis vollständiger Streuungskurven angesehen werden. Da die oberste Grenze des spezifischen Gewichtes unserer Versuchsanordnung bei S.G. 1080 lag, konnte ein grosser Teil der Zellen nicht erfasst werden, die mit ihrem spezifischen Gewicht über dieser Grenze liegen.
2. Die Auswertung wurde durch Zellveränderungen beeinflusst, die mechanische Ursachen haben dürften. Die Zellen im pathologisch veränderten Blut erwiesen sich als weit empfindlicher gegenüber Belastungen durch den Trennungsgang als die von uns untersuchten Carcinomzellen.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Silicon - Flotation werden die Streuungskurven des spezifischen Gewichtes für Carcinomzellen bei sieben Genitalcarcinomen ermittelt. Eine Abhängigkeit des spezifischen Gewichtes der Carcinomzellen von der Lokalisation des betreffenden Carcinoms konnte nicht festgestellt werden. Hingegen wurde eine Abhängigkeit des spezifischen Gewichtes der Carcinomzellen von der histologischen Struktur und vom Reifungsgrad des Carcinoms beobachtet.

Bei der unreifen Form des Adenocarcinoms hatten 34 % aller gefundenen Tumorzellen ein spezifisches Gewicht von 1056; Der Maximalwert für die Streuung der mittelreifen Form lag mit 35,2 % bei einem spezifischen Gewicht von 1054. 37 % aller Zellen des reifen Adenocarcinoms fanden wir bei einem spezifischen Gewicht von 1052. Wir beobachteten also mit zunehmendem Reifungsgrad eine Abnahme des spezifischen Gewichtes.

Das spezifische Gewicht der Carcinomzellen aller untersuchten Plattenepithelcarcinome war im Durchschnitt geringer als bei den Adenocarcinomen. Alle Verteilungskurven der bearbeiteten Plattenepithelcarcinome verlaufen über einen relativ grossen Streuungsbereich (1062 - 1050).

Die Streuungskurve des von uns untersuchten Ovarialcarcinoms (Konglomerattumor; papillär - alveoläres Adenocarcinom.) wurde in ihrem Verlauf durch die Vielgestalt der ausgezählten Zellen geprägt:

1. grosse Streubreite (1060 - 1050)
2. steiler Anstieg zu Beginn, flacher zweigipfliger Verlauf im Maximalbereich.

In Zusatzversuchen wurde die Streuung des spezifischen Gewichtes von pathologischen Blutkörperchen bei myeloischer und lymphatischer Leukämie innerhalb unserer Versuchsanordnung bestimmt.

Lymphoblasten und Erythroblasten waren in ihrem spez. Gewicht schwerer als 1074;

Myeloblasten und Promyelocyten fanden wir bis zu einem spezifischen Gewicht von 1070 im Sediment der einzelnen Trennungsgänge.

Metamyelocyten, Myelocyten, stabkernige Leukocyten und Lymphocyten fanden wir in den Kontrollausstrichen aller Trennungsgänge, wobei das spezifische Gewicht der Lymphocyten am geringsten war.

Innerhalb unserer Versuchsanordnung ist also eine Abgrenzung dieser Zellen von Carcinomzellen nur zu einem bestimmten Teil möglich. Unsere Ergebnisse bestätigen die Arbeitsfähigkeit der Seal^o schen Methode zur Gewinnung von Tumorzellen aus dem strömenden Blut, zeigen aber gleichzeitig deren Grenzen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AGRANOFF, B.W., VALLEE, B.L. and WAUGH, D.F.:
Centrifugal subfractionation of polymorphonuclear leukocytes, lymphocytes and erythrocytes.
Blood 9, 804 (1954).
2. BUCKLEY, E.S., POWELL, M.J. and GIBSON, J.G.:
The separation of the formed elements of whole blood by means of fraction.
J. Laborat. Clin. Med. 36, 29 (1950)
3. FAWCETT, D.W., VALLEE, B.L. and SOULE, M.H.:
Method for concentration and segregation of malignant cells from bloody, pleural and peritoneal fluids.
Science 111, 34 (1950)
4. KELLNER, G.:
Eine neue Methode zur Anreicherung von Leukocyten aus kleinen Blutmengen.
Zentralblatt für Mikroskopie, 8, 320, (1953)
(Verlag Fromme & Co. Wien.)
5. SEAL, S.H.:
Silicon flotation: A simple quantitative method for the isolation of free-floating cancer cells from the blood.
Cancer 12, 590 (1959)
6. ULLMANN:
Encyclopädie der Technologischen Chemie
(Verlag Urban & Schwarzenberg)
Band 1;
a) Flotation. S. 666. SIEDLER, P.
b) Strömungstechnik, S. 13. KLUGE, F.
c) Inhomogene Medien. S. 67. MESKAT, W.

A N H A N G : Tabellen mit den Zählwerten der einzelnen Versuche.

Filter Nr.	Tumorzellkerne, kompakt, hyperchrom.	Tumorzellen mit aufge- lockertem, polychromem Kern und Plasmarand	Polychrome Zellkerne ohne Plasmasaum	Fragliche Zellen	Gesamtzahl der exakt diagnosti- zierten Zellen
1	1	-	--	6	1
2	3	4	2	4	9
3	1	-	-	6	1
4	-	-	-	4	0
5	-	-	-	3	0
6	-	8	-	16	8
7	2	12	-	12	14
8	24	48	-	5	72
9	40	32	-	20	72
10	98	92	2	34	192
11	20	16	16	4	52
12	18	20	-	32	38
13	1244	2882	192	154	4341
14	862	1296	448	138	2806
15	1364	1020	46	228	2431
16	1220	668	12	103	1900
16K	648	344	28	248	1020

TABELLE 1: Unreifes Adenocarcinom des Corpus Uteri

Filter Nr.	Tumorzellkeme, kompakt, hyperchrom.	Tumorzellen mit aufge- lockertem, polychromem Kern und Plasmarand	Polychrome Zellkerne ohne Plasmasaum	Fragliche Zellen	Gesamtzahl der exakt diagnosti- zierten Zellen
1	-	-	-	-	-
2	-	20	16	28	36
3	20	52	44	24	116
4	36	24	48	32	108
5	40	16	24	18	80
6	1056	1920	1912	132	4978
7	912	2016	3408	52	6336
8	4800	8670	9036	272	22506
9	3200	5780	6840	652	15820
10	986	5810	4120	186	10916
10K	38	84	46	18	168

TABELLE 2: Reifes Adenocarcinom des Corpus.

Filter Nr.	Tumorzellkerne, kompakt, hyperchrom.	Tumorzellen mit aufge- lockertem, polychromem Kern und Plasmarand	Polychrome Zellkerne ohne Plasmasaum	Fragliche Zellen	Gesamtzahl der exakt diagnosti- zierten Zellen
1	6	-	2	6	8
2	6	-	2	10	8
3	22	-	26	20	48
4	48	-	44	32	92
5	12	-	4	24	16
6	32	44	48	68	124
7	248	368	348	148	1036
8	96	240	320	304	656
9	32	28	32	12	92
10	504	228	880	188	1612
11	628	756	1712	104	3096
12	748	520	1604	148	2872
13	1004	1880	2156	156	5040
14	1720	1280	3308	144	6308
15	1184	984	3852	164	6020
16		1132	3928	224	7240
16K		720	2504	176	4722

TABELLE 3: Unreifes Plattenepithelcarcinom des Collum Uteri.

Filter Nr.	Tumorzellkerne, kompakt, hyperchrom.	Tumorzellen mit aufge- lockertem, polychromem Kern und Plasmarand	Polychrome Zellkerne ohne Plasmasaum	Fragliche Zellen	Gesamtzahl der exakt diagnosti- zierten Zellen
1	11	27	2	16	40
2	32	16	12	24	60
3	38	12	10	18	60
4	12	40	32	8	84
5	1368	2368	540	20	4246
6	1124	3364	480	21	4968
7	1680	3560	444	46	5684
8	1504	2928	852	62	5284
9	1832	2780	776	38	5388
9K	1528	2344	480	66	4352

TABELLE 4: Mittelreifes Plattenepithelcarcinom des Collum Uteri.

Filter Nr.	Tumorzellkerne, kompakt, hyperchrom.	Tumorzellen mit aufge- lockertem, polychromem Kern und Plasmarand	Polychrome Zellkerne ohne Plasmasaum	Fragliche Zellen	Gesamtzahl der exakt diagnosti- zierten Zellen
1	152	44	184	32	380
2	88	38	148	44	274
3	16	4	24	40	44
4	20	12	16	48	48
5	108	84	112	52	304
6	28	72	148	24	248
7	64	76	136	84	276
8	32	40	124	64	196
9	12	36	32	48	80
10	32	8	40	36	80
11	64	76	180	64	320
12	52	44	212	32	308
13	2304	3480	24416	288	30200
14	1640	5416	38464	240	45520
15	2480	2688	21720	208	26888
16	492	1280	3360	118	5132
16K	2568	2936	13680	144	19184

TABELLE 5: Mittlereifiges Adenocarcinom des Collum Uteri.

Filter Nr.	Tumorzellkerne, kompakt, hyperchrom.	Tumorzellen mit aufge- lockertem, polychromem Kern und Plasmarand	Polychrome Zellkerne ohne Plasmasaum	Fragliche Zellen	Gesamtzahl der exakt diagnosti- zierten Zellen
1	-	8	-	12	8
2	-	-	-	24	0
3	52	104	36	-	192
4	76	56	32	88	164
5	4924	7296	3760	124	15980
6	5924	15708	2904	184	24536
7	7572	10736	2048	208	20356
8	6520	19956	1668	276	28144
9	7680	10940	1520	288	20140
9K	4960	7932	1628	232	14520

TABELLE 6: Papillär - alveoläres Adenocarcinom des Ovars.

Filter Nr.	Tumorzellkeme, kompakt, hyperchrom.	Tumorzellen mit auf- lockertem, polychromem Kern und Plasmarand	Polychrome Zellkerne ohne Plasmasaum	Fragliche Zellen	Gesamtzahl der exakt diagnosti- zierten Zellen
1	-	-	-	8	-
2	8	4	-	-	12
3	16	4	4	24	24
4	-	-	-	12	-
5	2096	1316	1120	28	4532
6	2756	1840	1612	80	6208
7	4212	3240	2824	48	10276
8	5924	3120	3128	68	12172
9	3856	1952	2916	72	8724
9K	2632	1640	1984	64	6256

TABELLE 7: Verhornendes Plattenepithelcarcinom der Vulva.

Herrn Professor BICKENBACH und Dr. SOOST
möchte ich für die Überlassung des Themas
und alle Hilfe während der Durchführung
der Arbeit danken.

LEBENS LAUF

Am 14. Februar 1935 wurde ich, Sven Tranekjer, als Sohn der Eheleute H. Tranekjer und Frau Friedel Tranekjer zu Sulzbach - Saar geboren.

Nach Absolvierung von Volksschule und Realgymnasium legte ich im Juli 1955 die Reifeprüfung ab.

An der Universität Heidelberg begann ich im September 1955 mit dem Studium der Medizin; im Februar 1958 bestand ich zu Heidelberg die ärztliche Vorprüfung.

Das Medizinische Staatsexamen legte ich im Juni 1961 an der Universität München ab, wo ich dann im Dezember 1961 die mündliche Doktorprüfung bestand.

